

INDUCCION Y SINCRONIZACION DE LA PUESTA EN EL RODABALLO
(*Scophthalmus maximus*) CON LHRHa: INFLUENCIA DEL ESTADO DE
DESARROLLO GONADAL

ALVARINO J.M.R.* & PELETEIRO J.B.

Instituto Español de Oceanografía. Apartado 1552, 36280 Vigo

* Dep. Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos, 28040 Madrid

SUMMARY: INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF SPAWNING IN TURBOT (*Scophthalmus maximus*) WITH LHRHa: EFFECT OF GONADAL MATURATION. Female turbot in different stages of gonadal maturation (initial, average or advanced) were injected i.m. with 5µ/kg PV of LHRHa. A limited response was detected in the initial gonadal maturation group, whereas induced spawning was experienced by 100% of average and advanced females, with a high level of synchronization. The number of ovulatory cycles was low, eggs quality variable and egg production high. New works are necessary to improve the performance of this technique.

Key words: Turbot, ovarian development, spawning, LHRHa.

RESUMEN: Hembras de rodaballo en distintos estados de maduración gonadal (inicial, medio o avanzado) recibieron una inyección i.m. de 5µ/Kg PV de LHRHa. La respuesta ha sido escasa o nula en hembras en desarrollo gonadal inicial, mientras que se ha inducido la puesta con un alto nivel de sincronización en el 100% de las hembras en estado medio o avanzado. El número de ciclos ovulatorios ha sido bajo, la calidad de las puestas variable y el volumen de huevos elevado. Se consideran necesarios nuevos trabajos al objeto de optimizar el rendimiento de esta técnica de control de reproducción.

Palabras clave: Rodaballo, desarrollo ovárico, puesta, LHRHa

INTRODUCCION

La reproducción del rodaballo en granjas comerciales ha alcanzado un importante nivel de control de las épocas de puesta que son desplazadas modificando el fotoperíodo y las temperaturas (FORES *et al.*, 1990). No obstante, las puestas naturales son poco frecuentes a no ser cuando los tanques tienen fondo de arena y la densidad de animales es inferior a 1Kg/m³ (GIRIN 1979, DEVAUCHELLE *et al.* 1986) y, por otra parte, son habituales los problemas derivados de falta de fertilización por mala calidad de los huevos producidos (BROMLEY *et al.*, 1986; BARTON, 1981). Las puestas obtenidas por masaje abdominal de las hembras tienen un rendimiento mayor que las puestas naturales y una elevada tasa de fertilización cuando se emplean métodos de predicción de la ovulación (McEVOY 1989).

Cuando las temperaturas se mantienen estables en un rango de 13 a 15 °C las ovulaciones se repiten con un intervalo medio de 3 días, si bien existe una importante variabilidad de unos a otros ciclos (1 a 5 días), individuos (hembras regulares o poco regulares) y entre épocas de puesta (la misma hembra se comporta de distinta forma de un año a otro). No obstante el momento en que una hembra inicia las puestas es muy variable, dando lugar a una gran dispersión en la aparición de los ciclos ovulatorios dentro de un mismo grupo de reproductores sometido a idénticas condiciones (PELETEIRO *et al.*, 1993).

La predicción de ovulación podría ser sustituida o complementada por técnicas de control de ovulación con LHRH, hasta ahora no utilizadas con éxito en el rodaballo. Si bien en especies de interés comercial, como dorada y lubina, el tratamiento con LHRHa resulta efectivo en la inducción de la puesta (ZOHAR, 1988; PRAT, 1991; ALVARINO *et al.*, 1992), en el rodaballo la utilización de dosis similares se ha traducido en la muerte de las hembras tratadas (PRAT, comunicación personal). El objetivo de este trabajo ha sido determinar la viabilidad de la inducción de ovulación con una dosis menor de LHRHa, en hembras en diferentes estados de desarrollo gonadal, así como la posible sincronización del período de puestas en las hembras inducidas.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado 17 hembras del stock de reproductores de rodaballo del Instituto Español de Oceanografía, sometidas a fotoperíodo natural y temperatura regulada (14 ± 1 °C durante todo el año). Las hembras fueron mantenidas en dos tanques de hormigón de 25 m³, con flujo abierto y aireación por airlifts, a una densidad de 2 Kgs/m³, en presencia de machos fluyentes. Los pesos medios fueron de 5540 ± 914 g (GRUPO A), 6315 ± 386 g (GRUPO B) y 5360 ± 437 (GRUPO C).

Las hembras fueron clasificadas según su desarrollo gonadal inicial de acuerdo con el criterio morfológico utilizado en el I.E.O. de modo rutinario: 0) hembras que no muestran signo alguno de desarrollo gonadal; I) desarrollo inicial del lóbulo ovárico posterior; II) desarrollo avanzado del lóbulo posterior e inicial para el anterior; y III) pleno desarrollo de ambos lóbulos ováricos (FORES *et al.*, 1990). De acuerdo con este criterio se formaron tres grupos: A) hembras con un nivel de desarrollo gonadal 0 y I (n=5); B) hembras con desarrollo gonadal II (n=5); y C) hembras con desarrollo gonadal III (n=7). Las hembras fueron inyectadas i.m. con 5 µg/Kg PV del análogo sintético de LHRH ((D-Ala⁶, Pro⁹-NET)-LHRH, Sigma) en una sola dosis; tres de ellas (n=1, Grupos A y B; n=2, Grupo C) fueron inyectadas con suero fisiológico y consideradas como controles. Las tres hembras del grupo A que no alcanzaron el estado III de desarrollo gonadal recibieron un nuevo tratamiento de 5µg/Kg PV de LHRHa a los 7 días de la primera inyección.

Se realizó una observación diaria de las hembras durante dos semanas, así como una canulación intraovárica al objeto de determinar el estado de maduración de los oocitos. Las hembras que habían alcanzado el estado III de desarrollo gonadal fueron presionadas abdominalmente para obtener huevos, determinándose el volumen de flotantes y no flotantes. Cuando las puestas sobrepasaban los 50 cc se fecundaron con semen de dos machos y se determinó el porcentaje de fertilización.

Dado que tras el masaje diario las hembras quedaban prácticamente vacías, se ha asumido que las puestas de volumen superior a 50 cc. corresponden a una nueva ovulación, aunque la fertilización haya resultado inferior al 60 %.

La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Witney, y la de proporciones mediante el test de Kruskal-Wallis (OSTLE & MENSING, 1975).

RESULTADOS

El tratamiento con LHRH ha dado lugar a puestas inducidas y sincronización en las hembras de los grupos B y C, mientras que las del grupo A han mostrado nula o escasa respuesta.

En el grupo A solamente una hembra ha reaccionado ante la inyección de LHRHa, con emisión de una sola puesta, aunque la fertilización fué del 0%. En el resto de los animales inyectados de este grupo se han detectado pequeños cambios en el desarrollo gonadal, sin que en ningún caso hayan sobrepasado el nivel II. En estos casos, la aplicación de un nuevo tratamiento a los 7 días tampoco dió lugar a maduración gonadal. El control no experimentó variación, manteniéndose en el nivel de desarrollo I durante el período experimental (dos semanas).

En el Grupo B, todas las hembras se encontraban inicialmente en estado de vitelogenésis avanzada, con la mayor parte de los oocitos entre 400 y 500 μ y núcleo en posición central. El control se ha mantenido en estado de desarrollo II con núcleos en posición central hasta el día 8, en que alcanza el estado III coincidiendo con la aparición de oocitos migrando; a partir del día 10 presentó oocitos ovulados sin que llegara a realizar la puesta. Por el contrario, en las hembras inyectadas los oocitos comienzan a migrar dos días después, apareciendo oocitos ovulados entre los días 3 y 5. Las primeras puestas se produjeron el día 6 en 3 hembras y el día 10 en la cuarta.

En el grupo C se han encontrado al inicio del experimento dos tipos de hembras, ya que tres de las inyectadas y dos controles presentaban el núcleo en posición central, con la mayor parte de los oocitos entre 500 y 600 μ , mientras que las dos restantes inyectadas mostraban un 20% de oocitos por encima de 600 μ , con el núcleo migrando o en posición periférica. Mientras que los controles evolucionaron hasta presentar los primeros oocitos ovulados el día 4 tras el inicio del experimento, las inyectadas los presentaron el día 3 (partiendo de núcleo en posición central) ó el día 1 (partiendo del núcleo migrando). Las primeras puestas se produjeron a los 4, 5 ó 7 días, partiendo de núcleo central y a los 2 ó 3 días partiendo de núcleo migrando. En los controles no se han obtenido puestas.

En la tabla I se muestra el rendimiento de las puestas obtenidas en los grupos B y C. Se han detectado diferencias en el número de ciclos ovulatorios y en la fecundidad, superior en ambos casos para las hembras del grupo C con un mayor desarrollo gonadal inicial ($p < 0,05$), así como en el intervalo entre inyección y primera puesta, menor para el grupo C ($p < 0,05$).

DISCUSION

El tratamiento con 5 μ g/Kg PV de LHRHa ha permitido la inducción de ovulación con una eficacia del 100% en los grupos de hembras B (desarrollo gonadal medio) y C (desarrollo gonadal avanzado), mientras que la eficacia sólo ha alcanzado el 25% en el grupo A (inicio del desarrollo gonadal).

El grado de sincronización en los grupos B y C ha sido notable, ya que las hembras han iniciado la puesta entre los 2 y 6 días (Grupo C) y los 6 y 10 días (Grupo B) tras la inyección de LHRHa. Se ha observado una tendencia al predominio del ciclo ovulatorio de corta duración, la mayoría de ellos de dos días, por lo que podría haberse producido una aceleración de los ritmos ovulatorios, en relación a la puesta natural, en torno a tres días de duración (PRAT *et al.*, 1992, FORES *et al.*, 1990). El hecho de que un 12 % de las puestas obtenidas hayan alcanzado un 0% de fertilización a pesar de realizar los muestreos cada 24 horas, indica que el proceso de sobremaduración de oocitos ovulados en el lumen ovárico podría a su vez ser acelerado por el tratamiento con LHRHa.

El rendimiento productivo se ha caracterizado por puestas de gran volumen y calidad variable, con fertilización entre el 0 y 98%. Dado que ninguno de los controles ha llegado a poner no es posible efectuar una comparación concluyente respecto al rendimiento global. No obstante se dispone de registro de puesta durante la temporada de 1991, en similares condiciones de fotoperiodo, temperatura y alimentación, de 5 de las hembras que han sido utilizadas en esta experiencia. Comparando los resultados de 1993 con los obtenidos en 1991 por esos mismos animales, se observa un período más corto en la aparición de las primeras puestas (8 vs 36 días), un menor número de ciclos ovulatorios (2,8 vs 6,8), así como una mayor producción de huevos, tanto flotantes (653 vs 317 cc) como totales (1084 vs 844 cc). No obstante, las condiciones de producción no son exactamente iguales en ambos años, por lo que sería prematuro concluir que el tratamiento con LHRHa aumenta el rendimiento de puesta frente a hembras no inducidas.

El hecho de que ninguno de los controles en los grupos B y C haya alcanzado la puesta, a pesar de que presentaban oocitos ovulados, se corresponde con la existencia frecuente de problemas en la emisión de gametos en hembras aparentemente maduras, que llega a afectar el 27.9% del stock (PELETEIRO *et al.*, 1993). El tratamiento con LHRHa podría constituir un método para eliminar o al menos reducir la importancia de este problema.

En cualquier caso, la aparición de coágulos sanguíneos y trozos de gónadas en las puestas del 44 % de las hembras inducidas, indica que se ha producido un drástico incremento del riego sanguíneo a nivel ovárico, probablemente ligado a hiperactividad y aumento del volumen normal de las puestas. No se puede descartar la hipótesis de que la dosis aplicada provoca una aceleración de la fase final de maduración en un mayor número de oocitos, aumentando el volumen y reduciendo el número de ciclos ovulatorios. Por ello, es probable que la dosis de 5 µg/Kg utilizada en este trabajo pueda ser reducida con buenos e incluso mejores resultados en la inducción de puesta de hembras que se encuentran en torno a la fase final de vitelogénesis, lo que será objeto de futuros trabajos de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a F. Prat su valiosa colaboración en el diseño de este experimento y a C. Gómez y J.J. Otero su inestimable ayuda en la realización del trabajo experimental.

BIBLIOGRAFIA

- ALVARIÑO, J.M.R., ZANUY, S., PRAT, F., CARRILLO, M. & MAÑANOS, B. 1992. *Aquaculture*, 102:177-186
- BARTON, L.A. 1981. En: *Egg-quality of turbot (Scophthalmus maximus L.) kept in captive conditions*. PhD Thesis, University of Liverpool, U.K.
- BROMLEY, P.J., SYKES, P.A. & HOWELL, B.R. 1986. *Aquaculture* 53:287-293
- DEVAUCHELLE, N., ALEXANDRE, J.C., LECORRE, N. & LETTY N. 1986. *Mariculture Committee, ICES C.M./F:10*
- FORES, R., IGLESIAS, J., OLMEDO, M., SANCHEZ, F.J. & PELETEIRO, J.B. 1990. *Aquacultural Engineering* 9:357-366
- GIRIN, M. 1979. *Public. C.N.E.X.O. Rapp. Sci. Tech.* N° 39
- McEVOY, L.A. 1989. *Cuaderno da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos* 3:9-28
- OSTLE, B. & MENSING R.W. 1975 *Statistics in Research*. Ames I.A.:Iowa State University Press.
- PELETEIRO J.B., RODRIGUEZ OJEA, G. & IGLESIAS, J. 1993 *ICES Symp. Mass Rearing of Juvenile Fish*. Poster n° 33. Bergen. Noruega.

- PRAT, F. 1991. En: *Control del ciclo reproductor de la lubina (Dicentrarchus labrax L.) por manipulación hormonal y ambiental*. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona.
- PRAT, F., MINKOFF, G., ZANUY, S., CARRILLO, M. & BROADHURST, A. 1992. En: *Broodstock Management and Egg & Larval Quality*, Abstract Book. Stirling, Scotland.
- ZOHAR, Y. 1988. En: *Reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics* pp. 47-62. INRA, Paris.

TABLA I: Producción y calidad de huevos en hembras inducidas a la puesta con LHRHa.

Grupo	Intervalo inyección a 1ª puesta (días)	Nº de ciclos ovulatorios	Intervalo entre ciclos (días)	Volumen huevos (cc.)		Fecundidad (1)	Fertilización (%)
				Flotantes	Totales		
B (n=4)	7.0 ± 1.0 (6 a 10) A	2.7 ± 0.5 (2 a 4) A	2.4 ± 0.4 (1 a 4)	726 ± 220 (162 a 1224)	1082 ± 291 (362 a 1692)	19.4 ± 4.7 (6 a 28) A	60.1 ± 10.1 (0 a 98)
C (n=5)	4.2 ± 0.9 (3 a 7) B	3.6 ± 0.4 (3 a 5) B	2.2 ± 0.2 (1 a 4)	877 ± 139 (380 a 1151)	1512 ± 107 (1159 a 1781)	29.1 ± 2.9 (22 a 37) B	65.1 ± 6.7 (0 a 92)

A, B: Medias seguidas de letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

(1): Expresada como cc. de huevo total producido por Kg. de peso.